NEDERLANDSCHE PLANTENZIEKTENKUNDIGE (PHYTOPATHOLOGISCHE) VEREENIGING

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

ONDER REDACTIE VAN

IR N. VAN POETEREN, PROF. DR W. K. J. ROEPKE EN PROF. DR JOHA WESTERDIJK

46e Jaargang | 3e aflevering | Mei/Juni 1940

VIRUSZUIVERING EN WAT ZIJ ONS LEERT OMTRENT DEN AARD VAN HET VIRUS [1])

DOOR

IR Y. VAN KOOT

INLEIDING

Het is nog slechts enkele jaren geleden, dat STANLEY (28) uit sap van mozaïekzieke tabaksplanten een eiwit in kristalvorm isoleerde, dat alle eigenschappen van het gewone tabaksmozaïekvirus bleek te bezitten. Hij was uitgegaan van de veronderstelling, dat het virus een gecompliceerd eiwit zou zijn en hij heeft daarom bij de zuivering gebruik gemaakt van de methoden van de eiwitchemie, die reeds bij de zuivering van enzymen met succes toegepast waren.

De ontdekking van STANLEY baarde vooral dáárom opzien, omdat het viruseiwit in den vorm van kristallen afgezonderd was. Dit gold niet alleen als een bewijs voor de zuiverheid van het geïsoleerde viruseiwit, maar was bovendien moeilijk in overeenstemming te brengen met de toen vrij algemeen heerschende opvatting, dat het virus een levend organisme was. Toch was er reeds eerder twijfel ontstaan over den aard van het virus, vooral tengevolge van de ontdekking van een aantal viren, die een geringere afmeting bleken te hebben dan de enkelvoudige eiwitmoleculen van het haemocyanine.

Zoo is dan opnieuw de onvruchtbare strijdvraag ontbrand, of het virus al dan niet een levend organisme is. Men moet STANLEY volkomen gelijk geven, wanneer hij beweert, dat de eenige mogelijkheid om hierin tot een oplossing te komen is, door nauwgezet onderzoek een duidelijker beeld te verkrijgen betreffende den aard van het virus. Dit is nog slechts met een klein aantal viren gebeurd. Het gewone tabaksmozaïekvirus is van deze viren wel het uitvoerigst bestudeerd.

[1]) Onderzoek verricht aan het Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek te Wageningen (zie ook noot op blz. 119).

De bedoeling van dit artikel is een systematisch overzicht te geven van de zuivering van het tabaksmozaïekvirus en van de verdere onderzoekingen, die met dit gezuiverde virus verricht zijn. De zuivering van andere viren zal daarbij slechts terloops ter sprake gebracht worden.

I. CHEMISCHE ZUIVERING VAN HET VIRUS

a. Voorbehandeling en klaring van het sap.

Men gebruikt hiervoor bij voorkeur jonge, in vochtige omgeving gegroeide tabaksplanten, die ± 1 maand tevoren met het virus geïnoculeerd zijn. Zulke planten bevatten een maximum hoeveelheid virus en slechts een geringe hoeveelheid moeilijk te verwijderen kleurstoffen.

De planten laat men bevriezen, waarna het sap er door malen gemakkelijker uitgeperst kan worden. STANLEY (29) voegt bij dit extract Na_2HPO_4 om de pH constant te houden. BAWDEN en PIRIE (2) voegen in plaats van Na_2HPO_4 0,05-0,1% NaCN toe, hetgeen twee voordeelen heeft:

1e. Gisting door schimmels en bacteriën in het sap wordt aldus grootendeels voorkomen.

2e. Op deze wijze wordt voorkomen dat de toegevoegde P op de een of andere manier aan het viruseiwit adsorbeert, waardoor een verkeerd beeld van het P-gehalte van het eiwit zou kunnen worden verkregen. Aangaande dit P-gehalte bestaat nl. geen overeenstemming.

Het sap wordt nu eerst geklaard. Hierbij worden de groene bestanddeelen, die niet in opgelosten toestand in het sap voorkomen, verwijderd. Dit kan op verschillende manieren gebeuren:

1e. Door filtratie door celiet (STANLEY, 29). Celiet bestaat uit gezuiverde infusoriënaarde van een bepaalde fijnheidsgraad. Het celiet geraakt tijdens de filtratie gemakkelijk verstopt. Daarom moet ook aan het sap een zekere hoeveelheid celiet toegevoegd worden. De filtratie dient te geschieden bij een neutrale pH, omdat het virus in zuur milieu aan het celiet adsorbeert, terwijl het in alcalisch milieu snel geïnactiveerd wordt.

2e. Door verhitting tot 70° C. (BAWDEN en PIRIE). Hierdoor coaguleeren verschillende eiwitten, waarna de filtratie veel vlotter verloopt.

3e. Bij sommige viren, zooals het aardappel X-virus, die wat minder resistent zijn, is de verhitting minder goed toe te passen. PFANKUCH en KAUSCHE (21) passen bij de zuivering van dit virus daarom een andere methode toe. Zij verkrijgen een klaring door bij 0° C. CO_2 door het sap te leiden. Dezelfde methode was reeds

toegepast door KENNETH SMITH en DONCASTER (27) voor de klaring van virushoudend sap voor de bepaling van de deeltjesgrootte van het virus door filtratie door collodion-membranen.

b. *Afscheiding van het virus uit het sap.*

Het virus wordt in zijn hoedanigheid van colloïdaal eiwit in oplossing gehouden door de beide volgende eigenschappen:

1e. Door het bezit van een watermantel. Het virus is echter weinig gehydrateerd (= hydrophoob).

2e. Door de electrische lading. Deze is afhankelijk van de pH. Bij een pH = 3,3 wordt het virus geheel ontladen, dit is het iso-electrische punt.

De meest selectieve methode voor de afscheiding van het virus is het uitzouten met $(NH_4)_2SO_4$. Hierdoor heeft tegelijk een ontlading en een onttrekking van den watermantel plaats. Bij een verzadiging van 25–30% met dit zout kan men vrijwel al het viruseiwit neerslaan, terwijl de normale planteneiwitten in oplossing blijven. Tengevolge van het gering verschil in sg tusschen de ammoniumsulfaat-oplossing en het virusneerslag, laat dit laatste zich moeilijk volkomen uitcentrifugeeren. Het wordt daarom ook wel door filtratie door celiet afgescheiden, waarna het in gedestilleerd water van een pH = 7 opgelost wordt.

BAWDEN en PIRIE (1) scheiden het virus af door de pH met behulp van zoutzuur op het iso-electrische punt te brengen. Deze methode is minder selectief: ook normale planteneiwitten slaan onder die omstandigheden neer. Men lost het viruseiwit weer op door toevoeging van NaOH tot een pH van 7—8 bereikt is. De normale planteneiwitten blijven dan grootendeels onoplosbaar en zijn door centrifugeeren te verwijderen.

Men maakt vaak gebruik van een adsorbens. Zoo laat STANLEY (29) het virus bij een pH van ± 4,5 adsorbeeren aan celiet, en wascht het er bij een pH = 8 weer uit (elutie).

Het mond- en klauwzeervirus is zeer gevoelig voor pH's buiten het gebied 7—9. Het gelukte aan Dr JANSSEN (12) dit virus te adsorbeeren aan gips en het daarna weer te elueeren zonder de pH te wijzigen. De adsorbtie heeft plaats na een gedeeltelijke wateronttrekking door een alcohol-aether mengsel in een verzadigde gipsoplossing. De andere eiwitten blijven in oplossing. Het gipsneerslag wordt opgelost in ammonium-acetaat, waarbij het virus eveneens in oplossing gaat. Dit kan dan met $(NH_4)_2SO_4$ neergeslagen worden.

Het tabaksmozaïekvirus kan, door het herhaalde malen te precipiteeren en weer op te lossen, gezuiverd worden van de kleurstoffen. Hiervoor bestaan echter betere methoden. Is het

virus eenmaal zoover gezuiverd, dan kan men het in zwak zuur milieu (pH = 5 door toevoeging van azijnzuur) met $(NH_4)_2SO_4$ neerslaan als fijne naaldvormige kristallen, die 0,02—0,03 mm lang zijn (STANLEY, 29).

c. *Verwijdering van de kleurstoffen.*

Hiervoor zijn verschillende methoden bedacht:

1e. STANLEY gebruikte hiervoor aanvankelijk basisch loodacetaat, maar vond spoedig een betere methode (30). Bij de waterige virus-oplossing voegt hij 5% CaO-oplossing, waardoor de pH op 8 gebracht wordt, daarna wordt gefiltreerd door celiet. Uit het filtraat zijn de kleurstoffen dan grootendeels verdwenen.

2e. RISCHKOV en GROMYKO (24) behandelen de virus-oplossing achtereenvolgens met 2% en 1% kool. Dit is een zeer geschikte methode. De kleurstoffen adsorbeeren aan de kool, terwijl vrijwel al het virus in oplossing blijft. De kool kan verwijderd worden door centrifugeeren of door filtratie door celiet.

3e. Door te centrifugeeren met een zeer hoog toerental kan men het virus zonder kleurstoffen afscheiden (2, 43).

4e. BAWDEN en PIRIE (1) verkrijgen een volkomen kleurloos preparaat door de virus-oplossing gedurende één nacht te behandelen met 0,2% trypsine bij 38 °C en een pH = 8. Zij beschouwen de kleurstoffen, die vooral in oude planten veel voorkomen, ten deele als oxydatieproducten van het virus, welke zeer moeilijk van het virus te scheiden zijn. Zij worden echter door de trypsine-behandeling ontleed.

II. ZUIVERING MET BEHULP VAN DE ULTRA-CENTRIFUGE

a. *Afscheiding van het virus.*

Met behulp van de ultracentrifuge is het mogelijk virusdeeltjes en andere zware eiwitmoleculen uit een oplossing neer te slaan door de versterking van de zwaartekracht. Men kan reeds een kracht van 1.000.000 × de zwaartekracht bereiken. Dit is slechts mogelijk door een groot aantal omwentelingen per minuut en een kleine straal.

$$\text{Centrifugaalkracht} = m\frac{v^2}{R} = 4\pi^2 m n^2 R.$$

m = massa; R = straal; n = aantal omwentelingen.

De grens wordt hier gesteld door den aard van het materiaal. Zelfs staal wordt bij deze kracht gemakkelijk uiteengetrokken.

De zuivering vindt plaats door het plantensap afwisselend te centrifugeeren in minder snelle centrifuges, waarin het virus in oplossing blijft, maar de grovere bestanddeelen precipiteeren,

en in ultracentrifuges, waarin het virus neerslaat.

De voordeelen van deze methode zijn de snelle zuivering en het weinig ingrijpende karakter van de behandeling. Hierdoor is het mogelijk geworden verschillende weinig stabiele viren te zuiveren, welke bovendien in veel geringere concentraties in het plantensap voorkomen dan het gewone tabaksmozaïekvirus. Deze methode is veel toegepast door WYCKOFF (40), o.a. bij het ring-spot virus. Hij verkreeg sterk geconcentreerde viruspraeparaten, die blijkbaar bestonden uit eiwitten met een zeer hoog moleculair gewicht. Talrijke viren zijn aldus geïsoleerd uit verschillende gewassen.

De hoeveelheid virus, die zoo verkregen werd, was echter meestal gering, terwijl ook de gevoeligheid en de korte levensduur van deze viren een nader onderzoek bemoeilijkten. Het is dan ook feitelijk in het geheel niet bewezen, dat deze viren niets anders dan eiwitten met een zeer hoog moleculair gewicht zijn.

b. *Zware eiwitten in sap van gezonde planten.*

Onlangs deden LORING, OSBORN en WYCKOFF (17) een ontdekking, welke aan de resultaten verkregen door de zuivering met de ultracentrifuge een in nog sterker mate hypothetisch karakter verleende. Zij isoleerden uit sap van mozaïekzieke boonen- en erwtenplanten door ultracentrifugatie een drietal zware eiwitten, waarin een zekere concentratie van de virusactiviteit merkbaar was. Zij isoleerden echter uit de gezonde planten deze zelfde drie zware eiwitten. Hun conclusie was, dat de virusconcentratie zoo klein was, dat er geen sedimentatiegrens was waar te nemen, òf dat deze geheel samenviel met die van één van de drie normaal voorkomende zware eiwitten.

PRICE en WYCKOFF (22) vonden ook in andere planten dezelfde zware eiwitten. Zij blijken iets lichter te zijn dan de deeltjes van het gewone tabaksmozaïekvirus en de daaraan verwante komkommer-viren. Het is daardoor mogelijk deze viren grootendeels van het normale zware planteneiwit te scheiden door gedurende korte tijden te centrifugeeren.

Dezelfde zware eiwitten komen ook in tabak- en tomaatplanten voor, zij het in sterk wisselend gehalte (BAWDEN en PIRIE, 4). De oorzaak dat men ze niet eerder ontdekt heeft, is de groote gevoeligheid van deze eiwitten, waardoor zij tijdens de langdurige chemische zuivering reeds lang vernietigd zijn. Zij kunnen direct al niet tegen het bevriezen en evenmin tegen de verhitting. Zij denatureeren snel bij kamertemperatuur en slaan door zuur-toevoeging irreversibel neer. Door trypsine worden zij gemakkelijk ontleed. De zuivering van de weinig stabiele

viren door de ultracentrifuge wordt er echter zeer door bemoeilijkt.

III. CONCENTRATIEBEPALING VAN HET VIRUS

a. *Door middel van het infectievermogen.*

Het infectievermogen van een viruspraeparaat wordt bepaald door dit in verschillende verdunningen uit te wrijven op de bladeren van planten zooals *Nicotiana glutinosa*, *Datura stramonium* of *Phaseolus vulgaris*, die op elk binnengedrongen virusdeeltje reageeren met een necrotisch vlekje (= local lesion), zonder dat er een uitbreiding van de symptomen plaats heeft. Men kan met een hoeveelheid van 10^{-9} gram van het gezuiverde viruspraeparaat opgelost in 1 cc water nog infectie verkrijgen.

Het gebruiken van meerdere verdunningen is noodig, omdat er geen eenvoudige evenredigheid bestaat tusschen de virusconcentratie en het aantal „local lesions" (BEST, 7). Bij zwakke verdunningen daalt het aantal „local lesions" lang niet in die mate als de virusconcentratie. Een concentratie van $\pm$ 10^{-6} gram virus per cc is de meest geschikte voor de bepaling.

Er bestaan echter groote individueele verschillen in gevoeligheid tusschen verschillende planten en zelfs tusschen de verschillende bladeren van één plant. Hierdoor is de concentratiebepaling nooit zeer nauwkeurig. Oudere bladeren reageeren met minder necrotische vlekjes. Men past daarom vaak de „halve blad"-methode toe, wanneer men slechts twee objecten heeft te vergelijken. Bij gebruik van 40—50 bladeren van *Phaseolus vulgaris* kan dan een verschil van 10% vastgesteld worden (LORING, 15). Met *Nicotiana glutinosa* kan onder die omstandigheden pas een verschil van 20% aangetoond worden.

b. *Door middel van de serologische activiteit.*

Wanneer men het virus brengt in het bloed van bepaalde dieren (b.v. van een konijn), dan worden hierin antistoffen gevormd. Het beste is, dat men volkomen gezuiverd virus in het bloed spuit, want anders moet men het anti-serum eerst laten inwerken op sap van gezonde planten (CHESTER, 8). Ook deze methode is niet zeer nauwkeurig, daar de hoeveelheid precipitaat, die men verkrijgt, in sterke mate afhankelijk is van de verhouding, waarin het virus en het anti-serum bij elkaar gebracht worden.

De methode heeft echter enkele voordeelen:

1e. Het resultaat wordt snel verkregen. Op de verschijning

van de „local lesions" moet men 's winters daarentegen soms wel twee weken wachten.

2e. Onder bepaalde omstandigheden treedt er tijdens de zuivering een aggregatie van de virusdeeltjes op, waardoor de infectieproeven geen juist beeld meer geven van de virusconcentratie. De serologische activiteit wordt hierdoor echter niet in het minst beïnvloed.

Een nadeel is, dat door bepaalde behandelingen het infectievermogen van het virus verloren kan gaan, terwijl het reactievermogen met het anti-serum intact blijft.

Indien het virus en het anti-serum in optimale combinatie gemengd worden, dan is dit mengsel inactief. Door verhitting tot 78° C en pepsine-behandeling kan men er het karakteristieke viruspraeparaat echter weer uit vrij maken (Bawden en Pirie, 1).

IV. EIGENSCHAPPEN VAN HET GEZUIVERDE VIRUS

a. *De virus-suspensie.*

Een neutrale, waterige oplossing van het viruseiwit is eenigszins opalescent, maar kleurloos. Wanneer deze vloeistof in beweging wordt gebracht, dan vormen er zich slierten in met een zijdeachtige glans. Dit is een gevolg van den langgerekten vorm van de virusdeeltjes. Om de optische activiteit te meten moet men de vloeistof op een pH = 11 brengen. Dan verdwijnt de opalescentie. De virus-activiteit gaat echter tegelijkertijd verloren. Men vindt onder die omstandigheden een specifieke draaiing van — 0,43° per mg N (Stanley, 29).

Wanneer men een virus-suspensie met een voldoend hooge virusconcentratie (>2%) eenigen tijd stil laat staan, dan vormen er zich twee lagen (Bawden en Pirie, 1). De onderste laag is waterhelder en dubbelbrekend. Dit is een gevolg van de zeer hooge virusconcentratie, waardoor de virusdeeltjes zich richten. De bovenste laag, evenals de oorspronkelijke suspensie, vertoont dit verschijnsel alleen als zij in beweging wordt gebracht: stroomings-anisotropie. Ook dit is een gevolg van het zich richten van de virusdeeltjes en niet het gevolg van optredende spanningen (Lauffer, 13). Hierop wijst o.a. het feit, dat de dubbele breking nog eenigen tijd te zien is na het ophouden van de strooming, terwijl zij vrijwel niet optreedt, wanneer het viruseiwit opgelost wordt in vloeistoffen, die ongeveer dezelfde brekingsindex hebben als het viruseiwit.

Volgens Bawden en Pirie (1) zou het sap van gezonde tabaksplanten geen stroomings-dubbele breking vertoonen: volgens

TAKAHASHI en RAWLINS (41) daarentegen wel, mits het sap niet van te voren bevroren is. Het verschijnsel is hier wel veel zwakker. Misschien wordt het veroorzaakt door de zware eiwitten in gezonde planten, die immers door bevriezing vernietigd worden.

b. *De viruskristallen.*

Deze zijn naaldvormig en hebben een lengte van ± 20 μ en een diameter van ± 0,4 μ. Het zijn feitelijk geen echte kristallen, daar de rangschikking slechts in twee richtingen regelmatig is. De langgerekte deeltjes hebben zich slechts zijdelings langs elkaar gelegd; zij vormen zgn. vloeibare kristallen. De kristalvorm is dan ook zeker geen bewijs voor de zuiverheid van het viruseiwit, want deeltjes van gelijken vorm, maar van ongelijke samenstelling kunnen evengoed dergelijke kristallen vormen. Deze vezelstructuur is gebleken uit het X-stralen-diagram (BAWDEN en PIRIE, 1).

Spiervezels geven een dergelijk beeld te zien, terwijl ook bij deelingen van de celkern een dergelijke oriëntatie optreedt. Men mag hieruit dan ook niet besluiten, dat het virus geen levend organisme is.

Het is echter niet onmogelijk, dat met een betere techniek drie-dimensionale viruskristallen verkregen zouden kunnen worden, daar zulke kristallen, die virus-activiteit bezitten, wèl in de planten voorkomen (BERNAL, 26). Bovendien heeft men een ander virus (het Bushy stunt virus van de tomaat) in volledig kristallijnen vorm als rhombische kristallen kunnen afscheiden (BAWDEN en PIRIE, 3).

Verder is uit het X-stralen onderzoek nog gebleken, dat de intramoleculaire ruimten bij het uitdrogen van het viruseiwit gelijk blijven. Slechts de afstanden tusschen de virusstaafjes veranderen. Dit wijst er op, dat het virus een massief eiwit is zonder intern water. Dit stemt overeen met het hooge sg (1,37). In dit opzicht wijkt het virus dus volkomen af van de bacteriën.

c. *Vorm en grootte van de virusdeeltjes.*

De diameter van de afzonderlijke virusdeeltjes kan door X-straal metingen worden vastgesteld. Deze bedraagt ± 150Å. De lengte is op deze wijze niet vast te stellen. Volgens BAWDEN en PIRIE (1) moet de lengte minstens 10 × de diameter bedragen, af te leiden uit de virusconcentratie, waarbij anisotropie optreedt. Dit gebeurt bij een concentratie, waarbij de deeltjes elkaar beïnvloeden, wat afhankelijk is van hun lengte. Uit deze afmetingen en uit het sg van 1,37 is een moleculair gewicht te berekenen voor het virusdeeltje van tusschen de 10 en 20 millioen.

Ook de ultracentrifuge kan men gebruiken voor het bepalen van het moleculair gewicht (WYCKOFF, BISCOE en STANLEY, 46). Men bepaalt dan de sedimentatie-constante (= een maat voor de sedimentatie-snelheid) door gedurende korten tijd met een zeer groot aantal omwentelingen te centrifugeeren. Men schakelt daardoor den invloed van de diffusie uit. De virusconcentraties worden gemeten tijdens het centrifugeeren met behulp van optische methoden (JAEGER, 11). Heeft men één enkele, homogene stof, dan ziet men een scherpe sedimentatiegrens. Dit is bij het tabaksmozaïekvirus vaak het geval, wat echter geen absoluut bewijs is voor de zuiverheid, want verschillende stoffen kunnen dezelfde sedimentatie-constante hebben. In vele gevallen is er een vage, of zijn er meerdere sedimentatiegrenzen gevonden. Hierop zal later nog worden teruggekomen.

Uit de sedimentatie-constante leidde men aanvankelijk een moleculairgewicht af van ± 17.000.000. Bij deze berekening had men echter aangenomen, dat de virusdeeltjes bolvormig waren. Dit is echter allerminst het geval. Uit viscositeits-metingen van virus-oplossingen van verschillende concentratie konden FRAMPTON en NEURATH (9) afleiden, dat de virusdeeltjes ± 37 × zoo lang waren als hun diameter is. Berekeningen op deze basis leveren een mol. gew. van 42.500.000, dus 2½ maal zoo hoog als oorspronkelijk werd aangenomen (LAUFFER, 14).

Dit is een buitengewoon hooge waarde voor een eiwitmolecuul. Men kent geen enzymen met een mol. gew. boven 100.000, terwijl men tot voor kort meende, dat in sap van gezonde tabaksplanten geen zwaardere eiwitmoleculen voorkwamen dan met een gewicht van 30.000.

In dergelijke groote moleculen kunnen gemakkelijk bindingsverschuivingen, isomeren en polymerisaties optreden, waarbij de oorspronkelijke eigenschappen vrijwel behouden blijven. Hieruit zou volgens STANLEY (29) het voorkomen van een groot aantal stammen van het tabaksmozaïekvirus en het optreden van mutaties verklaard kunnen worden.

d. *Chemische samenstelling van het virus.*

Deze is geheel die van een eiwit. BAWDEN en PIRIE (1) geven de volgende percentages op: 51% C, 7,1% H, 16,7% N, ± 0,5% S en 0,5% P. Het percentage S wisselt sterk. Bovendien bevat het virus ± 2,5% koolhydraat. De P en het koolhydraat zijn af te scheiden als nucleïnezuur. Aanvankelijk beweerde STANLEY (31), dat door dialyse bij een pH van 8—9 het nucleïnezuur geheel verwijderd kan worden, zonder dat het virus zijn infectievermogen verliest. Volgens BAWDEN en PIRIE kunnen onder deze

omstandigheden inderdaad het nucleïnezuur en de fosfor afgescheiden worden, maar gaat hiermee een evenredige daling van het infectievermogen gepaard. Waarschijnlijk was in het virus-praeparaat van STANLEY nog een spoortje P aanwezig, dat echter niet meer aangetoond kon worden. Latere onderzoekingen van STANLEY bevestigen nl. de waarnemingen van BAWDEN en PIRIE. Nog een aanwijzing, dat het nucleïnezuur een integreerend bestanddeel van het viruseiwit vormt, is het feit, dat het nucleïnezuur in het viruseiwit niet aangetast wordt door nuclease.

Het tabaksmozaïekvirus heeft dus het karakter van een nucleoproteïne. Dit is eveneens het geval met alle andere tot nu toe geanalyseerde viren. In dit opzicht onderscheidt het virus zich scherp van enzymen, die nimmer kerneiwit bevatten. Volgens RAWLINS en TAKAHASHI (23) bestaat een belangrijk deel van het materiaal van spermatozoën-koppen uit dubbelbrekende nucleoproteïnen in vloeibaar kristallijnen toestand en zou het daarom niet onmogelijk zijn, dat het virus een organisme is, dat uit dergelijke nucleoproteïnen bestaat. Het virus onderscheidt zich echter van alle andere micro-organismen door het feit, dat het uitsluitend uit nucleoproteïnen bestaat. Door hitte-ontleding verkrijgt men alleen nucleïnezuur en gedenatureerd eiwit, terwijl geen diffundeerbare bestanddeelen aangetoond kunnen worden (BAWDEN en PIRIE, 1). Opmerkelijk is echter, dat het nucleïnezuur van het virus van een ander karakter is, dan het nucleïnezuur van de celkernen van de planten en de meeste micro-organismen. Dit laatste bevat nl. desoxypentose, terwijl het nucleïnezuur van het virus een koolhydraat bevat van het ribose-type.

V. VERGELIJKING VAN VERSCHILLENDE VIRUS-ISOLATIES

a. *Hetzelfde virus uit verschillende waardplanten.*

Men heeft het tabaksmozaïekvirus gewonnen uit verschillende, uiteenloopende planten, zooals tabak, tomaat (LORING en STANLEY, 18), spinazie, Phlox en zelfs uit weefselcultures van tomaatwortels (STANLEY, 39). Het viruseiwit uit al deze planten verkregen, heeft dezelfde chemische samenstelling, hetzelfde isoelectrische punt, dezelfde sedimentatie-constante. Het is even infectieus en ook serologisch volkomen identiek. Toch bezitten de Phlox-planten niet de geringste serologische verwantschap met de tabaksplanten. Dit vormt een sterke aanwijzing, dat het geïsoleerde eiwit inderdaad het virus is.

Slechts de virusconcentratie is in de verschillende planten niet dezelfde. Terwijl uit tabak per liter sap $\pm$ 2 gram van het gewone tabaksmozaïekvirus verkregen kan worden, bedraagt

de virusopbrengst uit tomaatplanten ruim 1 gram en uit spinazie slechts 0,15 gram (STANLEY, 37). Ook is de virusopbrengst uit hevig zieke planten grooter dan uit minder zieke planten. Dit geldt ook voor andere viren. Zoo kunnen tabaksplanten, welke aangetast zijn door het ring-spot virus soms schijnbaar herstellen. Zij zijn dan immuun voor een tweede infectie met het virus, maar bevatten dit toch nog in onveranderden toestand. De hoeveelheid virus in zulke planten bedraagt slechts $^1/_6$ van de hoeveelheid, die in zeer zieke planten voorkomt.

b. *Verschillende stammen van het tabaksmozaiekvirus.*

Het is gebleken, dat tusschen de viruseiwitten van de verschillende stammen van het tabaksmozaïekvirus wèl verschillen bestaan. Deze zijn echter zeer gering. Zoo zijn volgens STANLEY (31) de kristallen van het aucubamozaïekvirus iets grooter, terwijl het virus iets minder oplosbaar is en een 20% grootere sedimentatie-constante heeft. Dit alles wijst er op, dat de aucubavirusdeeltjes iets grooter zijn, hetgeen bevestigd wordt door ultrafiltratie proeven. Volgens BAWDEN en PIRIE (1) is het verschil zelfs nog geringer. Ook het gewone strepenvirus van de tomaat wijkt weinig af. Hiervan zijn de kristallen iets kleiner (zie tweede deel van dit artikel, blz. 119 e.v.).

Ook de komkommermozaïek-viren no 3 en 4 zijn door BAWDEN en PIRIE (2) als naaldvormige kristallen afgescheiden. Deze wijken iets sterker af van het gewone tabaksmozaïekvirus. Hun iso-electrische punt ligt bij een pH van 4,8 (pH 3,3 bij het gewone tabaksmozaïekvirus). In verband hiermee is het interessant dat het komkommersap een veel hoogere pH bezit dan het tabakssap (resp. 7,8 en 5,8). Deze komkommerviren komen alleen voor in de familie van de Cucurbitaceae, terwijl het gewone tabaksmozaïekvirus niet op deze planten overgebracht kan worden. Het is dus merkwaardig, dat er niettemin verwantschap bestaat tusschen deze viren. Deze verwantschap is door BAWDEN en PIRIE (2) langs serologischen weg nader onderzocht. Dit is gebeurd door zgn. kruis-adsorbtie-proeven. Men laat het anti-serum eerst reageeren met het verwante virus in optimale verhouding en daarna met het virus, waartegen het serum gemaakt is. Men vindt dan, dat anti-gewoon mozaïek-serum, na gereageerd te hebben met het aucubavirus, niet meer reageert met het gewone mozaïekvirus. Hieruit volgt, dat het gewone mozaïekvirus geen enkel serologisch werkzaam bestanddeel bevat, dat het aucubamozaïekvirus niet eveneens bevat. Het omgekeerde blijkt niet het geval te zijn. BAWDEN en PIRIE vinden de volgende „factoren"-samenstelling:

gewoon mozaïek	A B
aucuba mozaïek	A B C
enation mozaïek	A C D

De factor A is verreweg de sterkste en blijkt eveneens voor te komen in de komkommerviren no 3 en 4. De factor A schijnt echter een combinatie van twee andere factoren te zijn, die in deze viren niet in dezelfde verhouding voorkomen.

c. *Andere viren.*

Er zijn reeds verschillende andere viren gezuiverd en geanalyseerd, waaronder het aardappel X-virus of het latente mozaïekvirus en het Bushy stunt virus van de tomaat. Zij blijken allen te bestaan uit nucleoproteïnen. Zij vertoonen echter geen serologische verwantschap met het tabaksmozaïekvirus. De deeltjes van het Bushy stunt virus zijn niet langgerekt. Er komt bij dit virus dan ook nimmer anisotropie voor, terwijl het 3-dimensionale, rhombische kristallen vormt (Bawden en Pirie, 3). Het aardappel X-virus vertoont wel een stroomings-dubbele breking, maar men heeft nooit naaldvormige kristallen kunnen verkrijgen (Bawden, 26). In het algemeen verschillen de geïsoleerde viruseiwitten sterker naarmate zij ook pathologisch meer uiteenloopen.

Bij vergelijking van de concentraties, waarin al deze viren (ook die, welke uitsluitend door ultracentrifuge verkregen zijn) in het plantensap voorkomen, blijkt dat het tabaksmozaïekvirus een uitzonderlijke positie inneemt. Van dit virus is nl. gemiddeld 2 gram per liter plantensap aanwezig; van alle andere viren daarentegen slechts 0,001—0,1 gram (Stanley, 34).

VI. DE INACTIVEERING VAN HET VIRUS

a. *De inwerking van enzymen.*

Toevoeging van trypsine aan het viruseiwit heeft wel een bijna volkomen verlies van het infectievermogen ten gevolge, maar dit is niet het resultaat van een proteolytische werking. De inactiveering voltrekt zich oogenblikkelijk en is onafhankelijk van de pH. Het blijkt dan ook een werking van de trypsine op de plantencellen te zijn. Wanneer men de trypsine weer uit de virus-suspensie verwijdert, herkrijgt deze haar oorspronkelijke activiteit (Bawden en Pirie, 1).

Over de werking van pepsine zijn de onderzoekers het niet geheel eens. Volgens proeven door Stanley uitgevoerd met ongezuiverd virus zou het tabaksmozaïekvirus door pepsine geïnactiveerd kunnen worden; volgens Bawden en Pirie is deze

inactiveering niet grooter dan die welke onder overigens dezelfde omstandigheden (lage pH, hooge temperatuur) zonder pepsine toevoeging optreedt.

Met enkele andere enzym-houdende praeparaten, zooals papaïne en clupeïne, kan men het virus uit een verdunde, neutrale oplossing neerslaan zonder dat het infectievermogen verloren gaat.

Men kan dus wel aannemen, dat het tabaksmozaïekvirus niet merkbaar door proteolytische enzymen gehydrolyseerd wordt. In dit opzicht gedraagt het virus zich evenzoo als organismen. De nucleoproteïnen, die in het sap van gezonde planten voorkomen, worden daarentegen gemakkelijk door verschillende proteolytische enzymen ontleed. Ook de eiwitten met hoog moleculair gewicht, die in gezonde planten voorkomen, kunnen door trypsine gemakkelijk afgebroken worden (Bawden en Pirie, 4).

b. *Denaturatie van het virus.*

Men kan het virus op verscheidene manieren inactiveeren. Hiermede gaat echter niet steeds een denaturatie van het viruseiwit gepaard. Wanneer echter door bepaalde behandelingen het viruseiwit denatureert, dan verdwijnt ook steeds het infectievermogen.

Een dergelijke denaturatie treedt op wanneer men het viruseiwit in een neutrale oplossing onder toevoeging van een weinig zout verhit tot 90° C. Het eiwit slaat dan P-vrij neer. Uit de bovenstaande vloeistof kan men door toevoeging van een mineraal zuur het nucleïnezuur precipiteeren (Bawden en Pirie, 1). Eenzelfde denaturatie verkrijgt men door ijsazijn aan het viruseiwit toe te voegen. Ook bij een te hooge pH wordt het viruseiwit gedenatureerd.

c. *Inactiveering met behoud van de eiwitstructuur.*

Men kan de virus-activiteit op verschillende manieren vernietigen zonder dat het karakter van het viruseiwit aanmerkelijk gewijzigd wordt.

1e. Door uitdrogen. Men behoudt een oplosbaar nucleoproteïne, dat onder dezelfde omstandigheden neerslaat als het actieve viruseiwit (Bawden en Pirie, 1).

2e. Door bestraling met ultraviolet licht. Het virus wordt door ongeveer dezelfde golflengten geïnactiveerd als bacteriën. Er is echter een meer dan 100 maal zoo sterke bestraling voor noodig. De meest werkzame stralen zijn die, welke het sterkst geadsorbeerd worden door het viruseiwit (Stanley, 35).

3e. Door behandeling met formaline, H_2O_2 of HNO_2. Blijkbaar

is in al deze gevallen de inactiveering het gevolg van een zelfde soort reactie, waarschijnlijk een oxydatieproces. Dezelfde inactiveering treedt ook op na herhaalde filtraties door celiet, dat wellicht als katalysator functioneert voor de oxydatie door de O_2 van de lucht (Loring en Stanley, 18).

In al deze gevallen blijft de serologische werkzaamheid geheel onveranderd, terwijl ook de kristalvorm behouden kan blijven. Deze eigenschap van het virus zal, wanneer zij eveneens voorkomt bij voor dieren pathogene viren, van groote beteekenis kunnen worden voor de bereiding van vaccins.

Ook uit oudere planten kan men dergelijk geïnactiveerd, maar toch uitkristalliseerbaar viruseiwit verkrijgen. Dit geïnactiveerde viruseiwit kan door trypsine gemakkelijk ontleed worden, waardoor het mogelijk is het actieve virus zuiver te krijgen.

Het feit, dat het infectievermogen van het virus vernietigd kan worden zonder dat de structuur van het viruseiwit belangrijk gewijzigd wordt, wijst er op, dat het infectievermogen berust op het bezit van bepaalde actieve groepen. Naar den aard van deze groepen hebben Ross en Stanley (25) een nader onderzoek ingesteld. Zij behandelen het virus met formaline. De virusactiviteit daalt, terwijl tegelijkertijd bepaalde aminozuur- en reduceerende groepen (tryptophaan en indol nucleïne) in aantal afnemen. Wanneer de formaline door dialyse bij pH 3 verwijderd wordt, treedt een gedeeltelijk herstel van de virus-activiteit en van genoemde groepen op. Naarmate de inwerking van de formaline langer geduurd heeft, is het herstel na de verwijdering van de formaline geringer. Een gedeelte hiervan laat zich dan niet meer door dialyse verwijderen. Verschillende aminozuren reageeren met formaline op overeenkomstige wijze. Deze reactie verloopt meestal sneller, maar is aanvankelijk eveneens reversibel. Er treedt waarschijnlijk eerst een losse verbinding op, die na verdere reactie in een stabiele chemische verbinding overgaat.

VII. ZUIVERHEID VAN HET VIRUS

a. *Aanwijzingen, dat het eiwit identiek is met het virus.*

In het voorgaande zijn reeds verschillende feiten vermeld, die er op wijzen, dat het geïsoleerde eiwit met hoog moleculair gewicht werkelijk het virus is (Stanley, 36):

1e. Het infectievermogen van het sap van zieke planten blijkt vrijwel volkomen geconcentreerd te worden in het geïsoleerde eiwit.

2e. Men heeft dit eiwit alleen kunnen isoleeren uit sap van

zieke planten. Het eiwit reageert niet met serum verkregen door inspuiting van gezond sap.

3e. Uit zeer verschillende planten, die onderling niet de minste serologische verwantschap vertoonen, wordt volkomen hetzelfde viruseiwit geïsoleerd.

4e. Het adsorbtiespectrum van het viruseiwit komt geheel overeen met het destructiespectrum van de virus-activiteit.

5e. Denaturatie van het eiwit gaat steeds gepaard met vernietiging van de virus-activiteit.

b. *Pogingen om de virus-activiteit van het eiwit te scheiden.*

Men zou zich kunnen voorstellen, dat het virus op de een of andere manier aan het geïsoleerde eiwit geadsorbeerd is. Dit eiwit moet dan een reactieproduct van de plant zijn, daar het alleen in zieke planten voorkomt. De hoeveelheid virus zou in dat geval zeer gering moeten zijn, nl. niet meer dan 1% van het gezuiverde materiaal, omdat men anders deze onreinheid van het eiwit had moeten ontdekken.

Wanneer deze veronderstelling juist is, zal het virus nog aanmerkelijk kleiner moeten zijn dan de eiwitmoleculen, en de aard van het virus zou er dus zeker niet minder raadselachtig door worden.

Om hieromtrent zekerheid te verkrijgen heeft men op velerlei wijze getracht de virus-activiteit van het eiwit te scheiden. Dit is echter nimmer gelukt. Na een tiental herkristallisaties is de virus-activiteit nog volledig in het eiwit geconcentreerd (Stanley, 29). Dit is echter geen absoluut bewijs voor de zuiverheid.

Wanneer wij echter te doen hebben met een eiwitdrager, waaraan de virusdeeltjes geadsorbeerd zijn, dan zal deze adsorbtie hoogstwaarschijnlijk afhankelijk zijn van de pH, d.w.z. van de electrische lading van de eiwitdeeltjes. Men zou dan na centrifugatie van het viruseiwit bij pH's aan beide zijden van het iso-electrische punt een verschillende adsorbtie moeten vinden. Dit is echter niet het geval. Steeds blijkt de virus-activiteit evenredig te zijn met de hoeveelheid eiwit met hoog moleculair gewicht (Stanley, 32). Dit blijkt ook nog het geval te zijn, wanneer tevoren verschillende andere proteïnen, waaraan het virus eventueel zou kunnen adsorbeeren, toegevoegd zijn. Ook door dialyse of filtratie onder verschillende omstandigheden bleek het niet mogelijk de virus-activiteit van het eiwit te scheiden, zoodat het wel zeker is, dat er van geen adsorbtie sprake is.

c. *Verontreiniging met gelijksoortige deeltjes.*

Er bestaat nog wel altijd een mogelijkheid, dat de virusdeeltjes

vermengd zijn met geheel overeenkomstige niet actieve deeltjes, die dan ongeveer hetzelfde iso-electrische punt, dezelfde sedimentatie-constante enz. moeten bezitten. Dit is bij de viruskristallen van STANLEY werkelijk het geval gebleken. Dit is aangetoond door de zeer gevoelige, anaphylactische reactie: Guinea-biggetjes, behandeld met eiwit van gezonde tabaksplanten, reageerden duidelijk op de naaldvormige kristallen. Dit was het gevolg van een geringe verontreiniging met zware eiwitten uit gezonde planten. Na behandeling met trypsine blijft deze reactie uit (BAWDEN en PIRIE, 2). Het viruspraeparaat wordt door deze behandeling tevens mooier homogeen wat betreft de sedimentatie-constante. Ook kan het aldus van geïnactiveerd virus bevrijd worden. Volgens MARTIN, BALLS en MCKINNEY (19) is de hoeveelheid trypsine-resistent eiwit aanmerkelijk geringer dan aanvankelijk werd aangenomen. Het is dan ook niet uitgesloten, dat er dergelijke inactieve deeltjes in het viruspraeparaat aanwezig blijven, want in het gunstigste geval hebben wij $\pm 10^{-10}$ gram viruseiwit noodig voor een infectie en deze hoeveelheid vertegenwoordigt nog altijd een groot aantal eiwitmoleculen (BAWDEN, 26), nl.:

$$\frac{\text{aantal mol. per gr. mol.}}{\text{mol. gew.} \times 10^{10}} = \frac{60 \times 10^{22}}{40 \times 10^{6} \times 10^{10}} = 1{,}5 \times 10^{6}.$$

VIII. AGGREGATIE-TOESTAND VAN HET VIRUS.

In bijna alle opzichten heeft het gezuiverde virus dezelfde eigenschappen als het virus, zooals het in het plantensap voorkomt. Er zijn echter verschillende aanwijzingen, dat er tijdens de zuivering een lineaire aggregatie van de virusdeeltjes optreedt. KENNETH SMITH en DONCASTER (27) hadden dit verschijnsel reeds opgemerkt bij de filtratie van de virusdeeltjes door collodion-membranen voor de bepaling van hun grootte. Zij voerden een gedeeltelijke zuivering uit om te voorkomen, dat het filter te snel verstopt raakte. Dit had echter spoedig tot gevolg, dat de virusdeeltjes niet langer door dezelfde kleine poriën gefiltreerd konden worden als voor de zuivering. Men had hiervan in het bijzonder last, nadat wijzigingen in de pH van het plantensap waren opgetreden. Volgens TAKAHASHI en RAWLINS (42) is de aggregatie-toestand afhankelijk van de pH. Bij een pH = 7 vinden zij tengevolge van een geringere aggregatie een geringere stroomings-dubbele breking en een grooter infectievermogen dan bij een pH = 5,6. Een overeenkomstige waar-

neming deed Lauffer (14). Volgens hem nemen de viscositeit en de stroomings-dubbele breking van de virus-oplossing toe bij de nadering van het iso-electrische punt tengevolge van een lineaire aggregatie. Bij het bereiken van dit punt daalt de viscositeit plotseling sterk door een zijdelingsche associatie van de virusdeeltjes.

Volgens Bawden en Pirie (1) heeft er tijdens de zuivering een aanmerkelijke lineaire aggregatie van de virusdeeltjes plaats. De X-straal metingen wezen er reeds op, dat de staafvormige deeltjes waarschijnlijk opgebouwd zijn uit lineair gerangschikte deeltjes, die zeer veel korter zijn. Ook de anisotropie is volgens hen veel kleiner in het onbehandelde tabakssap dan in een gezuiverde virus-oplossing van dezelfde concentratie. In het algemeen is de serologische activiteit van de viruspraeparaten evenredig met het infectievermogen. Vergelijkt men echter het gezuiverde virus met het oorspronkelijke virushoudende sap, dan blijkt bij een gelijk blijvende activiteit t.o.v. het antiserum, het virushoudende tabakssap enkele malen zoo infectieus te zijn als het gezuiverde virus. Door de aggregatie wordt het aantal virusdeeltjes kleiner en daardoor het infectievermogen geringer; de hoeveelheid eiwit blijft gelijk en dus ook de hoeveelheid precipitaat met het anti-serum. Ook de filtreerbaarheid wordt veel geringer. In het ongezuiverde sap ligt de grens bij een poriëngrootte van 53 m μ, in de gezuiverde virus-oplossing bij een poriëngrootte van 450 m μ.

Deze resultaten zijn volkomen in strijd met de bewering van Wyckoff, Biscoe en Stanley (46), dat de sedimentatie-constante gelijk zou zijn voor het viruseiwit in het ongezuiverde plantensap, voor het gecentrifugeerde en voor het chemisch gezuiverde viruseiwit. Bawden en Pirie veronderstellen, dat misschien reeds tijdens het centrifugeeren een aggregatie van de virusdeeltjes plaats heeft. Loring, Lauffer en Stanley (16) hebben dit nader onderzocht. Zij geven toe, dat een drastische chemische behandeling tot zuivering van het virus, en in het bijzonder een langdurig blootstellen van het virus aan hooge zoutconcentraties, een lineaire aggregatie van twee virusdeeltjes kan veroorzaken, waardoor een iets grootere sedimentatie-constante optreedt. Drie sedimentaties door middel van de ultracentrifuge hadden echter geen irreversibele aggregatie tengevolge, zooals bleek uit infectie- en filtratieproeven en uit metingen van de stroomings-dubbele breking. Volgens Wyckoff (45) kan men in sap van planten, die langer dan één maand tevoren geïnoculeerd zijn, de zwaardere deeltjes met een iets grootere sedimentatie-constante direct aantreffen, terwijl het

virus uit planten, die pas een week tevoren geïnoculeerd zijn, zelfs niet door de behandeling met zouten tot aggregatie zou kunnen worden gebracht.

Wanneer men bedenkt, dat BAWDEN en PIRIE aan de volgens hen geaggregeerde virusdeeltjes ± dezelfde afmetingen toekennen als de Amerikaansche onderzoekers aan de volgens hen enkelvoudige virusdeeltjes, en wanneer men tevens bedenkt, dat de Engelsche onderzoekers veel grootere verschillen vinden, dan die het gevolg zouden kunnen zijn van het zich aan elkaar hechten van twee virusdeeltjes, dan is het niet duidelijk, hoe men deze resultaten met elkaar in overeenstemming kan brengen.

IX. VORMING VAN HET VIRUS IN DE PLANT.

a. Samenhang met X-bodies en hexagonale kristalplaten.

De hexagonale kristalplaten, die in de cellen van viruszieke planten voor kunnen komen, zijn echte kristallen en bezitten virus-activiteit. Deze kristallen komen in hoofdzaak slechts voor bij het gewone en het aucuba tabaksmozaïekvirus, hetgeen waarschijnlijk verband houdt met de hooge concentraties, waarin deze viren in het plantensap voorkomen. Het meest treft men de kristallen aan bij het aucubamozaïek, waarvan het eiwit iets minder oplosbaar is dan van het gewone tabaksmozaïek (STANLEY, 34). Het is aan Miss BEALE (6) gelukt door zuur-toevoeging deze kristalplaten uiteen te doen vallen in naaldjes, die een groote overeenkomst vertoonen met de virusnaaldjes van STANLEY.

BAWDEN en Miss SHEFFIELD (5) verkregen door inwerking van verschillende eiwitachtige stoffen, zooals protaminen, histonen of clupeïne, op het viruseiwit bij een neutrale pH onoplosbare complexen, die gelijken op X-bodies. Zij veronderstellen, dat in de zieke plant stoffen gevormd worden, die op een dergelijke wijze met het virus reageeren. De X-bodies en de kristalplaten zouden dan dus niet uitsluitend uit virus bestaan, en hun vorming zou niet in de eerste plaats van de virusconcentratie afhankelijk zijn. Een bevestiging hiervan is onlangs gevonden door KAUSCHE (47), wien het gelukt is hexagonale kristalplaten in vitro te verkrijgen door gezuiverd viruseiwit toe te voegen aan sap van mozaïekzieke tabaksplanten, dat alleen door een koolbehandeling gezuiverd was.

b. Het eiwitgehalte van de viruszieke plant.

De virusproductie verloopt na de inoculatie zeer snel, zoodat de hoeveelheid virus na vier dagen reeds vermillioenvoudigd

is (STANLEY, 33). Hiermede gaat gepaard een toename van de hoeveelheid oplosbaar eiwit in de plant tot minstens het 5-voudige van de hoeveelheid, die in gezonde planten voorkomt. Minstens 80 % hiervan bestaat uit viruseiwit. De hoeveelheid oplosbaar eiwit met laag moleculair gewicht neemt iets af. Het is aan MARTIN, BALLS en MCKINNEY (19) gebleken, dat de hoeveelheid onoplosbaar eiwit echter tegelijkertijd zoo sterk afneemt, dat de totale hoeveelheid eiwit in de plant ongeveer gelijk blijft. Dit behoeft echter nog niet te beteekenen, dat het virus gevormd wordt uit de onoplosbare eiwitten van de gezonde plant; het is ook mogelijk, dat tengevolge van de virusproductie de productie van het onoplosbare, normale planteneiwit geremd wordt, en dat dit eiwit geleidelijk afgebroken wordt.

Men kan zich voorstellen, dat het virus gevormd wordt uit een van de drie volgende normale eiwitbestanddeelen van de gezonde plant:

1e. Uit het onoplosbare eiwit. Hiervoor pleit de omstandigheid, dat dit eiwit in de zieke plant in aanmerkelijk geringere hoeveelheid voorkomt. De onoplosbare nucleoproteïnen bevatten echter nucleïnezuur, dat van een ander type is dan het nucleïnezuur van het viruseiwit. Een ander bezwaar tegen deze hypothese zal onder 3e genoemd worden.

2e. Uit de oplosbare eiwitten met een hoog moleculair gewicht. Volgens THORNBERRY en MCKINNEY (44) komt ook dit eiwit minder voor, naarmate de plant langer ziek is geweest. Ook hier bestaat echter de mogelijkheid, dat de productie van dit eiwit tengevolge van de virusinfectie gestagneerd is. Het eiwit wijkt echter in zijn eigenschappen vrij sterk af van het viruseiwit; zoo bevat het geen P.

3e. Uit de eiwitten met laag moleculair gewicht (maximaal 30.000). Deze hypothese acht men vrij algemeen de meest waarschijnlijke. Het virus wordt nl. gereproduceerd in planten, die zoodanig verschillen, dat zij alleen de kleinere, niet serologisch actieve bestanddeelen gemeenschappelijk hebben. Het virus zou dus opgebouwd worden uit tamelijk eenvoudige bestanddeelen. BAWDEN en PIRIE (1) hebben in gezond tabakssap een betrekkelijk eenvoudig nucleoproteïne gevonden, dat 1 % P bevat, en dat tot nu toe nog niet aangetoond is kunnen worden in sap van viruszieke planten. Het kan gemakkelijk ontleed worden door sommige proteolytische enzymen en slaat niet neer bij een 50 %-ige verzadiging met $(NH_4)_2SO_4$. Misschien wordt het virus uit dit eiwit gevormd.

c. Stanley's hypothesen betreffende de reproductie van het virus.

Aanvankelijk vergeleek STANLEY (29) de virusproductie met de autokatalytische omzetting van trypsinogeen in trypsine, wanneer er een kleine hoeveelheid van deze laatste stof aan toegevoegd wordt. Het eenige verschil was volgens STANLEY, dat voor de vorming van het tabaksmozaïekvirus de aanwezigheid van levende cellen noodzakelijk is. Dit verklaarde hij door aan te nemen, dat de stof waaruit het virus gevormd moet worden een onstabiel eiwit is, dat alleen bestaanbaar is in verbinding met de levende cel. Men kan zich een dergelijke autokatalytische virusproductie alleen voorstellen uit een ongeveer gelijke stof, waarbij tijdens de reactie energie vrijkomt: kettingreactie. Wij hebben echter gezien, dat het waarschijnlijker is, dat het virus opgebouwd wordt uit veel kleinere eiwitdeeltjes, waarbij juist energie opgeslagen wordt.

Daarom heeft STANLEY een nieuwe theorie opgesteld (38). Hij gaat er daarbij van uit, dat in de levende cel zeer uiteenloopende bestanddeelen voorkomen. De meer ingewikkelde bestanddeelen worden door middel van enzymatische processen uit de meer eenvoudige gevormd. De meest complexe zijn de eiwitten en volgens de nieuwste inzichten van de eiwitchemie bestaan er intracellulaire proteïnasen, die in staat zijn eiwitten te synthetiseeren, gelijk aan hun eigen structuur. STANLEY neemt nu aan, dat op dezelfde wijze het virus gevormd wordt. Hij oppert de mogelijkheid, dat door inbrenging van virus de vorming van deeltjes van dezelfde structuur wellicht op dezelfde wijze bevorderd wordt als het geval is bij kristallisaties tengevolge van het inbrengen van een enkel kristal.

X. DE AARD VAN HET VIRUS.

Het karakter van het virus is tweezijdig. Eenerzijds gelijkt het op een levend organisme, voor zoover betreft zijn pathogeniteit en zijn vermogen tot reproductie en mutatie binnen de levende cellen van een aantal geschikte waardplanten. Aan den anderen kant heeft het virus het karakter van een groot molecuul met constante physische en chemische eigenschappen. Men mag de virusdeeltjes dan ook zeker niet beschouwen als onzichtbaar kleine bacteriën. Dit blijkt wel het duidelijkst uit de beide volgende, reeds vermelde eigenschappen:

1e. Bij ontleding van het virus komen alleen eiwitbouwstoffen en nucleïnezuur vrij.

2e. Het virus bezit geen intern water.

Het is dus een eiwit zonder meer. Alle tot nu toe bekende organismen bestaan daarentegen uit een eenheid, waarin een

wisselwerking tusschen verschillende soorten moleculen binnen een bepaald systeem plaats heeft.

Er doet zich nu de vraag voor of het mogelijk is, dat binnen het systeem van een enkel molecuul een zoodanige wisselwerking plaats kan vinden, dat een dergelijk molecuul de eigenschappen verkrijgt van een levend organisme. Sommige onderzoekers achten dit mogelijk (GORTNER, 10); zij beschouwen de virusdeeltjes als naakte kernen, die voor hun voeding afhankelijk zijn van de waardplanten. Het zou echter zeer voorbarig zijn het overgangskarakter van het virus op te vatten als een stadium in de evolutie van niet-levend naar levend. Een andere mogelijkheid is, dat wij bij de viren te maken hebben met micro-organismen, die tengevolge van hun parasitisme bepaalde functies verloren hebben, die overgenomen zijn door het omringende plasma van de waardplant (ANDREWES, 26). Dit proces zou wellicht voort kunnen schrijden tot slechts een enkel kernmolecuul overblijft. Er dient hier opgemerkt te worden, dat het zeer goed mogelijk is, dat de grootere, minder stabiele viren, die zich moeilijk tot onderzoek leenen, verschillende overgangen vormen van het virus-organisme naar het normale micro-organisme.

Wij zijn hiermede teruggekeerd tot het in de inleiding aangeroerde probleem, of het virus al dan niet een levend organisme is. Er is feitelijk geen onweerlegbaar bewijs aan te voeren voor de stelling, dat het virus geen levend organisme zou zijn. Reeds eerder is uiteengezet, dat de kristalachtige structuur van het virus geen bewijs vormt. Ook de omstandigheid, dat het tot nu toe niet gelukt is het virus buiten de levende cel te vermenigvuldigen, bewijst niets, daar een obligaat parasitisme ook bij hoogere organismen voorkomt. Zelfs het feit, dat er geen ademhaling vastgesteld kon worden, kan niet als een bewijs gelden, daar ditzelfde evenmin gelukt is bij sommige zaden en bacterie-sporen.

Het is trouwens moeilijk een juiste definitie van het leven te geven. Als de meest typische eigenschap van het leven kunnen wij echter wel beschouwen het vermogen tot vermenigvuldiging door deeling en groei. Dit houdt in, dat alle deeltjes niet volkomen gelijk kunnen zijn. De vloeibare kristallen wijzen echter slechts op een ongeveer gelijken vorm van de deeltjes van het tabaksmozaïekvirus. Ook de sedimentatiegrens is niet zoo scherp, dat men er uit mag besluiten tot een volkomen gelijkheid van de virusdeeltjes.

Men weet niet of de opbouw van het virus geschiedt door de plant of door het virus zelf. Een aanwijzing, dat de plant hierbij een rol speelt, is het feit, dat een aanzienlijke vermenigvuldiging

van het virus in het algemeen slechts plaats grijpt bij een goede groei van de plant. Het is echter heel goed mogelijk, dat dit slechts beteekent, dat de plant onder deze omstandigheden beter in staat is opnieuw de grondstoffen te produceeren, welke gebruikt worden voor de virusvorming, en die anders spoedig opgebruikt zouden zijn. Wanneer het gelukken zou het virus buiten de levende cel te vermenigvuldigen, dan zou bewezen zijn dat de opbouw door het virus zelf geschiedt. Nu vermelden PATRICK, LAIDLAW en ELFORD (20), dat zij uit rioolslijk een virus geïsoleerd hebben ± ter grootte van het vacciniavirus, dat inderdaad op kunstmatige voedingsbodems gekweekt kan worden. Ook dit is een aanwijzing voor het bestaan van overgangsvormen tusschen het tabaksmozaïekvirus en de gewone micro-organismen. Wij zullen ons dan ook moeten wennen aan de gedachte, dat de grens tusschen leven en dood niet zoo scherp te trekken is als wij ons dat altijd voorgesteld hebben. Evenzeer zullen wij ons vertrouwd moeten maken met het bestaan van infectieuze moleculen, waarvan het al dan niet levende karakter problematisch is. De naam *infectieuze nucleoproteïnen* door BAWDEN en PIRIE aan deze deeltjes gegeven, laat dit karakter terecht buiten beschouwing en geeft overigens den aard van de virusdeeltjes nauwkeurig weer.

EIGEN ONDERZOEK *)

ZUIVERING VAN HET TABAKSMOZAIEKVIRUS EN VAN HET GEWONE STREPENVIRUS VAN DE TOMAAT.

Beide viren werden geïsoleerd uit Rhenensche tabaksplanten. De met het eerste virus te infecteeren tabaksplanten werden gekweekt in een druivenserre, waar zij in een vochtige, beschaduwde omgeving stonden. De met het strepenvirus te infecteeren planten stonden daarentegen in een warenhuiskas in de volle zon en in een aanmerkelijk drogere atmosfeer. Het sap van deze laatste planten bleek dientengevolge een veel grootere hoeveelheid bruin pigment te bevatten. De tabaksplanten in de druivenserre vertoonden na het afsnijden een sterkere bladmisvorming, waarbij de bladeren vaak ten deele draadvormig werden. De planten hadden een ruime bemesting met stalmest (N-rijk) ontvangen om een weelderige bladontwikkeling te verzekeren.

De tabaksplanten werden ruim een maand na de inoculatie

*) Dit onderzoek heeft ten deele plaatsgevonden in samenwerking met Dr. Janssen op het laboratorium van het StaatsVeeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut, hetgeen mogelijk was dank zij de welwillende medewerking van den directeur van dit instituut, Dr. Frenkel.

afgesneden en aan bevriezing blootgesteld. De opnieuw uitgegroeide planten werden 2½ maand later nogmaals afgesneden. De bevroren planten werden gemalen in een eenvoudige vruchtenmolen. Aan het sap werd Na-cyanide toegevoegd ter voorkoming van gisting. Het bleek dat ½ gram per liter sap niet voldoende was, zoodat later 1 gram per liter toegevoegd werd.

Een gedeelte van het sap werd onmiddellijk gefiltreerd door celiet (Hyflo super cel) ongeveer volgens de methode van STANLEY. Er werd echter minder celiet aan het sap toegevoegd dan STANLEY gebruikte, omdat er steeds een zekere hoeveelheid virus in het celiet achterbleef en er toch reeds een goede filtratie plaats had bij gebruik van ± 20 gram per liter in plaats van 40 gram. Voor de filtratie werd de pH van het sap door toevoeging van ammonia op 7 gebracht en na de filtratie werd de celietkoek 2 maal uitgewasschen met gedestilleerd water.

De rest van het sap werd eerst verwarmd, ongeveer volgens de methode van BAWDEN en PIRIE. Daar de uitvlokking van het eiwit grootendeels geschiedde tusschen 55 en 60° C. werd het sap slechts verwarmd tot 65° C. en daarna snel afgekoeld. Toch had deze behandeling steeds een achteruitgang van het infectievermogen tengevolge, in het bijzonder bij het gewone tabaksmozaïekvirus. Later trad vaak eenig herstel van het infectievermogen op. Na de verwarming werd het sap gefiltreerd door een dunne laag celiet. Verwarmd sap van gezonde planten kon zelfs door enkel filtreerpapier gefiltreerd worden.

Het infectievermogen werd bepaald door van de verschillende viruspraeparaten verdunningen te maken, welke overeenkwamen met de verdunningen 1 : 100; 1 : 1000, en 1 : 10.000 van het oorspronkelijke sap. Deze werden uitgewreven op bladeren van Glutinosa-planten, telkens 1/20 cc per blad.

Hier volgt het resultaat van enkele concentratie-bepalingen:

Aantal „local lesions" op Nicotiana glutinosa

	Verdunning		
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Gewoon tabaksmozaiekvirus.			
Onbehandeld	116	10	4
Gefiltreerd door celiet	96	19	7
Celiet-koek	12	0	0
Verwarmd tot 65 °C	23	10	4
Strepenvirus van de tomaat.			
Onbehandeld	74	26	6
Gefiltreerd door celiet	95	11	3
Verwarmd tot 65 °C	47	11	5

Het aldus voorbehandelde sap is helder en heeft een meer of minder donkere roodbruine kleur. Wanneer dit sap eenigen tijd blijft staan, treedt er weer een troebeling in op. Het sap werd dan op de volgende wijze verder geklaard. De pH werd op 8 gebracht en het sap verzadigd met gips. Het gipsneerslag werd uitgecentrifugeerd in een continu-centrifuge, zooals gebruikt wordt voor het scheiden van het serum van de bloedlichaampjes en voor het scheiden van de room van de melk. Met deze centrifuge worden 8000 omwentelingen per minuut verkregen. Er kan echter nogal wat virus in het gipsneerslag achterblijven, zooals uit onderstaande cijfers blijkt. Het beste is dus waarschijnlijk om het virus direct na de filtratie door celiet met $(NH_4)_2SO_4$ af te scheiden.

Aantal „local lesions" op Nicotiana glutinosa

Strepenvirus van de tomaat	Verdunning		
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Gecentrifugeerd zonder gips	102	55	7
Gecentrifugeerd met gips	93	42	5
Suspensie van gipsneerslag	45	8	1

Uit het sap, dat alleen door celiet gefiltreerd was (niet verwarmd), werd het virus afgescheiden door toevoeging van een verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing, ongeveer volgens de methode van STANLEY. Het bleek echter zeer goed mogelijk deze virus-afscheiding te doen plaats hebben zonder de pH te veranderen. Meestal werd een hoeveelheid ammoniumsulfaat toegevoegd gelijk aan $^2/_3$ van de hoeveelheid sap; dit is dus tot een verzadiging van 40%. Met geringere hoeveelheden ammoniumsulfaat wordt ook reeds een aanzienlijk neerslag verkregen, hetwelk echter moeilijk volledig is af te scheiden. Het beste is het neerslag te laten bezinken en de bovenstaande heldere vloeistof zooveel mogelijk af te schenken of wel het neerslag af te tappen. Dit werd dan langzaam gecentrifugeerd in de bovengenoemde continu-centrifuge, waarin het virus zich in den vorm van een grijs neerslag tusschen de platen afzet, of wel door celiet gefiltreerd. In het laatste geval kan worden volstaan met de toevoeging van een hoeveelheid ammoniumsulfaat gelijk aan de helft van het sap-volume. Deze geheele bewerking had plaats bij een pH = 7 en het virusneerslag werd opgenomen in gedestilleerd water, waaraan een weinig ammoniumacetaat, eveneens van een pH = 7, toegevoegd was. Voor de beoordeeling van deze methode van virusafscheiding werd nagegaan hoeveel virus er was achter gebleven in het sap, waaruit het virus op verschillende manieren verwijderd was.

Aantal „local lesions" op Nicotiana glutinosa

Strepenvirus van de tomaat	Toegevoegde hoeveelheid amm. sulf.	Verdunning		
		1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Na uitcentrif. van amm.sulf.-prec. . .	1/3	46	8	2
Na uitcentrif. van amm.sulf.-prec. . .	2/3	6	2	0
Na affiltr. van amm.sulf.-prec.	1/2	6	5	0
Opgelost amm.sulf.-prec.	2/3	201	8	1

De laatste rij cijfers heeft betrekking op de wijze van afscheiding, die het meest werd toegepast.

De aldus verkregen virus-suspensie is sterk opalescent en vertoont wanneer zij in beweging gebracht wordt, duidelijke slierten. Zij is echter nog tamelijk sterk bruin gekleurd.

Uit het sap, dat bij de voorbehandeling verwarmd werd, is het virus afgescheiden op een andere wijze, die meer overeenkomt met de methode door Bawden en Pirie toegepast. Bij dit sap werd nl. zoutzuur gevoegd tot een pH bereikt was van 3,3. Er ontstaat dan een neerslag, dat aanmerkelijk zwaarder is dan het ammoniumsulfaat-neerslag, doordat nu ook normale planteneiwitten worden neergeslagen. Het neerslag kan betrekkelijk gemakkelijk afgescheiden worden door centrifugatie in de continucentrifuge of door filtratie door celiet. Er blijft steeds zeer weinig virus in het sap achter. Het neerslag werd opgenomen in gedestilleerd water. Daarna werd door toevoeging van NaOH de pH op 7 gebracht. Bij een pH = 3,3 wordt het virus sterk geadsorbeerd aan het celiet en dit bezinkt zeer snel. Bij een pH = 5 à 6 bezinkt een deel van het celiet en het virus niet langer. Bij een pH = 7 à 8 bezinkt het celiet weer volledig, terwijl het virus in oplossing blijft. Het normale planteneiwit lost echter niet op. Nadat deze suspensie in een gewone centrifuge (5000 omwentelingen per minuut) gecentrifugeerd is, kan de virushoudende vloeistof worden afgeschonken. Hieruit werd het virus nogmaals afgescheiden door verzadiging tot 40% met ammoniumsulfaat, op de wijze zooals reeds eerder behandeld is. Alleen werd nu gebruik gemaakt van de gewone centrifuge, omdat nu met een veel geringere hoeveelheid vloeistof gewerkt werd. Hier volgt de uitslag van enkele concentratie-bepalingen van het virus.

Aantal „local lesions" op Nicotiana glutinosa

Strepenvirus van de tomaat	Verdunning		
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Na uitcentrif. van zuur-prec.	1	0	0
Het opgeloste virus-prec.	137	64	11

De verwijdering van de kleurstoffen bleek zeer goed te kunnen geschieden met kool-poeder (Rischkov en Gromyko). Typisch is, dat het virus niet merkbaar aan de kool adsorbeert. Voor het weinig pigment bevattende tabaksmozaïek-virus was één behandeling met 1% kool voldoende. Voor het tomaatvirus waren twee behandelingen noodig, resp. met 2% en 1% kool. De verwijdering van de kool geschiedde het best door eerst het grootste gedeelte uit te centrifugeeren, en de laatste resten te verwijderen door te filtreeren door van te voren gewasschen celiet.

Aantal „local lesions" op Nicotiana glutinosa

Strepenvirus van de tomaat	Verdunning		
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Voor de kool-behandeling	152	19	
Na één behandeling met 2% kool .	160	27	

In verband met deze resultaten schijnt het mij toe, *dat ook de chemische zuivering van het virus behoorlijk snel kan geschieden, mits men uitgaat van planten, die in een vochtige en beschaduwde omgeving zijn gegroeid. De beste en snelste methode is dan waarschijnlijk het sap door celiet te filtreeren, het virus met ammoniumsulfaat af te scheiden en het één maal met behulp van kool van het pigment te bevrijden.* Dit alles kan uitgevoerd worden bij een pH = 7, zoodat dan waarschijnlijk weinig aggregatie van virusdeeltjes op zal treden.

De aldus gezuiverde virus-suspensie is nogal sterk opalescent en vrijwel kleurloos. Zij vertoont een duidelijke stroomings-dubbele breking. Door toevoeging van ammoniumsulfaat en een weinig azijnzuur (pH — 5) werden hieruit de naaldvormige viruskristallen verkregen. De naaldjes van het gewone tabaksmozaïekvirus zijn ongeveer 20–25 μ lang (afb. 1), de naaldjes van het gewone strepenvirus zijn wat kleiner en slechts ongeveer 15 μ lang (afb. 2). De afbeeldingen hebben betrekking op virus dat ongeveer volgens de methode Bawden en Pirie gezuiverd is. De naaldjes, die verkregen werden uit het sap, dat ongeveer volgens de methode Stanley gezuiverd was, waren iets fijner en korter. Het was moeilijk de dubbele breking van de kristallen zelf waar te nemen. Het gelukte niet de dubbele breking door kleuring te versterken. De J-kleurmiddelen reageeren niet op het eiwit en $AgNO_3$ veroorzaakte wel een violetkleuring, maar vernietigde tevens grootendeels de naaldvormige structuur. *Men kan de virusnaaldjes alleen verkrijgen, wanneer het virus geheel van kleurstoffen bevrijd is, en wanneer ammonium-sulfaat toegevoegd wordt.* Wan-

neer men de virussuspensie op laat drogen, dan ontstaat een doorzichtige gelatineuse laag.

Wanneer wij tot besluit de virus-concentratie van de gezuiverde viruspraeparaten met die van het oorspronkelijke sap vergelijken, dan zal blijken, *dat het infectievermogen van het gewone strepenvirus niettegenstaande de langdurige behandeling niet merkbaar verminderd is.* Het infectievermogen van het gewone tabaksmozaïekvirus is daarentegen sterk afgenomen. Toch zijn beide viren ongeveer op dezelfde wijze behandeld. Na de gips-zuivering heeft in het sap echter vaak geruimen tijd een te hooge pH geheerscht (tot 8,3). Misschien is het gewone tabaksmozaïek hiervoor gevoeliger dan het strepenvirus. Een andere mogelijkheid is, dat bij het tabaksmozaïekvirus een veel sterker aggregatie optreedt dan bij het strepenvirus. De cijfers in de volgende tabel zijn niet geheel vergelijkbaar, daar het aantal „local lesions" dat optreedt, sterk afhankelijk is van de omstandigheden, zooals b.v. de ouderdom van de Glutinosa-planten. In de voorgaande tabellen zijn daarom steeds tegelijk gedane titraties opgenomen (behalve de laatste rij van de derde tabel), die dus beter vergelijkbaar zijn.

Aantal „local lesions" op Nicotiana glutinosa

	Verdunning	
	1 : 100	1 : 1000
Gewoon tabaksmozaiekvirus :		
Voor de zuivering	116	10
Na STANLEY-zuivering	16	4
Na BAWDEN-zuivering	18	5
Strepenvirus van de tomaat :		
Voor de zuivering	74	26
Na STANLEY-zuivering	88	10
Na BAWDEN-zuivering	64	24

Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen.

Juni 1939.

SUMMARY

In the first part a survey is given of our present knowledge of purified viruses.

In the second part the following methods of purifying the ordinary tobacco mosaic virus and the single streak virus of the tomato are compared.

1. Filtration through celite and separation of the virus by different saturations with $(NH_4)_2 SO_4$ (STANLEY).

2. Heating to 70° C. and separation of the virus by adding HCl (Bawden and Pirie).

3. Removal of the pigments by treatment with coal (Rischkov and Gromyko).

A quick chemical method of purifying juice, which contains not too much pigments is filtration through celite, virus-precipitation with 40% $(NH_4)_2 SO_4$ and only one treatment with 1% or 2% coal, all at pH = 7.

The length of the needles of the tomato single streak virus is a little less (15 μ) than the length of the needles of the ordinary tobacco mosaic virus (20—25 μ).

The virus-activity of the tomato virus, as measured by local lesions on Nicotiana glutinosa remained intact during a long chemical purifying process, while the activity of the tobacco virus decreased to a considerable extent.

LITERATUUR

1. Bawden, F. C. and Pirie, N. W. The isolation and some properties of liquid crystalline substances from Solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. Proc. Roy. Soc. London 1937, 274-320.
2. ———, The relationships between crystalline preparations of cucumber viruses 3 and 4 and strains of tobacco mosaic virus. Brit. Journ. Exp. Pathology 1937, 275-291.
3. ———, Crystalline preparations of tomato bushy stunt virus. Brit. Journ. Exp. Pathology 1938, 251-263.
4. ———, A note of some protein constituents of normal tobacco and tomato leaves. Brit. Journ. Exp. Path. 1938, 264-267.
5. Bawden, F. C. and Sheffield, F. M. L. The intracellular inclusions of some plant virus diseases. Ann. Appl. Biol. 26, 1939, 102-115.
6. Beale, Helen Purdy, Relations of Stanley's crystalline tobacco virus protein to intracellular crystalline deposits. Contrib. Boyce Thompson Inst. 8, 1937, 413-431.
7. Best, R. J. The quantitative estimation of relative concentrations of the viruses of ordinary and yellow tobacco mosaics and of tomato spotted wilt by the primary lesion method. Austr. Journ. Exp. Biol. and med. Sci. 1937, 65-79.
8. Chester, K. S. Serological studies of plant viruses. Phytopathology, 27, 1937, 903-912.
9. Frampton, V. L. and Neurath, H. An estimate of the relative dimensions and diffusion constant of the tobacco mosaic virus protein Science, 1938, 468-469.
10. Gortner, R. A. Viruses, living or non-living? Science, 1938, 761-762.
11. Jaeger, F. M. De analytische ultracentrifuge en het onderzoek der filtreerbare virus-soorten. Chem. Weekblad, 1938, 419-431.
12. Janssen, L. W. Over mond- en klauwzeervirus. III. De bereiding van zeer zuiver virus. Meded. Staats Veeartsenijkundig Onderzoekings-Instituut, 3 m, 1936.
13. Lauffer, M. A. Optical properties of solutions of tobacco mosaic virus protein. Journ. Phys. Chemistry, 1938, 935-944.
14. ———, The viscosity of tobacco mosaic virus protein solutions, ourn. Biol. Chem. 1938, 443-453.

15. Loring, H. S. Accuracy in the measurement of the activity of tobacco mosaic virus protein. Journ. Biol. Chem. 1937, 637-647.
16. ———, Lauffer, M. A. and Stanley, W. M. Aggregation of purified tobacco mosaic virus. Nature, 1938, 841.
17. ———, Osborn, H. T. and Wyckoff, R. W. G. Ultracentrifugal isolation of high molecular weight proteins from broad bean and pea plants. Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med. 1938, 239-241.
18. ———, and Stanley, W. M. Isolation of crystalline tobacco mosaic virus protein from tomato plants. Journ. Biol. Chem. 1937, 551-572.
19. Martin, L. F., Balls, A. K. and McKinney, H. H. The protein content of mosaic tobacco. Science, 1938, 329-330.
20. Patrick, P., Laidlaw, F. R. S. and Elford, W. J. A new group of filterable organisms. Proc. Roy. Soc. London, 1936, 292-303.
21. Pfankuch, E. und Kausche, G. A. Zur Darstellung von hochgerei-, nigtem Kartoffel-X-Virus. Naturwiss. 1938, 382.
22. Price, W. C. and Wyckoff, R. W. G. The ultracentrifugation of the protein of cucumber viruses 3 and 4. Nature, 1938, 685-686.
23. Rawlins, T. E. and Takahashi, W. N. The nature of viruses. Science, 1938, 255-256.
24. Rischkov, V. L. and Gromyko. E. P. A new method for the purification of the tobacco mosaic virus. Compt. Rend. Ac. des Sciences de l'U.R.S.S. 1938, 203-205.
25. Ross, A. F. and Stanley, W. M. The partial reactivation of formolized tobacco mosaic virus protein. Journ. Gen. Phys. 1938, 165-191.
26. Smith, J. H., Andrewes, C. H., Bawden, F. C., Bernal, J. D., Farlane A. S. Mc and Garrod, L. P. Discussion on recent work on heavy proteins in virus infection and its bearing on the nature of viruses. Proc. Roy. Soc. London. 1938, 199-210.
27. Smith, K. M. and Doncaster, J. P. The preparation of Gradocol membranes and their application in the study of plant viruses. Potato Virus Research Station Cambridge, 1935. Repr. Parasitology Vol. 27, 1935.
28. Stanley, W. M. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. Science, 1935, 644-645.
29. ———, Chemical Studies on the virus of tobacco mosaic. VI. The isolation from diseased Turkish tobacco plants of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. Phytopath. Vol. 26, 1936, 305-320.
30. ———, VII. An improved method for the preparation of crystalline tobacco mosaic virus protein. Journ. Biol. Chem. 1936, 673-678.
31. ———, VIII. The isolation of a crystalline protein possessing the properties of aucuba mosaic virus. Journ. Biol. Chem. 1937, 519-534.
32. ———, IX. Correlation of virus activity and protein on centrifugation of protein from solution under various conditions. Journ. Biol. Chem. 1937, 535-550.
33. ———, X. The activity and yield of virus protein from plants diseased for different periods of time. Journ. Biol. Chem. 1937, 205-217.
34. ———, A comparative study of some effects of several different viruses on Turkish tobacco plants. Phytopathology, 27, 1937, 1152-1160.
35. ———, Some biochemical investigations on the crystalline tobacco mosaic virus proteins. Proc. Am. Phil. Soc. 1937, 447-453.
36. ———, The isolation and properties of tobacco mosaic and other virus proteins. The Harvy Lectures, 1938, 107-204.
37. ———, The biophysics and biochemistry of Viruses. Journ. Appl. Phys. 1938, 148-155.
38. ———, The reproduction of virus proteins. The Amer. Nat. 1938, 110-123.
39. ———, Aucuba mosaic virus protein isolated from diseased, excised tomato roots grown in vitro. Journ. Biol. Chem. 1938, 125-131.

40. STANLEY, W. M. and WYCKOFF, R. W. G. The isolation of tobacco ring spot and other virus proteins by ultracentrifugation. Science, 1937, 181.
41. TAKAHASHI, W. N. and RAWLINS, T. E. Stream double refraction exhibited by juice from both healthy and mosaic tobacco plants. Science, 1933, 284.
42. ———, Stream double refraction of preparations of crystalline tobacco mosaic protein. Science, 1937, 103-104.
43. THORNBERRY, H. H. Crystallization of tobacco mosaic virus protein. Science, 1938, 91-92.
44. ——— and MCKINNEY, H. H. Purification of Nicotiana virus 6 protein. Phytopathology, 29, 1939, 250-260.
45. WYCKOFF, R. W. G. Molecular sedimentation constants of tobacco mosaic virus proteins extracted from plants at intervals after inoculation. Journ. Biol. Chem. 1937, 219-224.
46. ———, BISCOE, J. and STANLEY, W. M. An ultracentrifugal analysis of the crystalline virus proteins isolated from plants diseased with different strains of tobacco mosaic virus. Journ. Biol. Chem. 1937, 275-289.

VERKLARING DER FIGUREN
EXPLANATION OF FIGURES

PLAAT II

Fig. 1. Kristallen van het gewone tabaksmozaïekvirus. Vloeistof opgedroogd, waardoor ook iets te zien is van ammoniumsulfaat-kristallen. 570 × vergroot.
(Virus-needles of ordinary tobacco mosaic. × 570).

Fig. 2. Kristallen van het gewone strepenvirus van de tomaat. Vloeistof eveneens opgedroogd. 570 × vergroot.
(Virus-needles of the single streak virus of the tomato. × 570).

Fig. 1. Kristallen van het tabaksmozaïekvirus

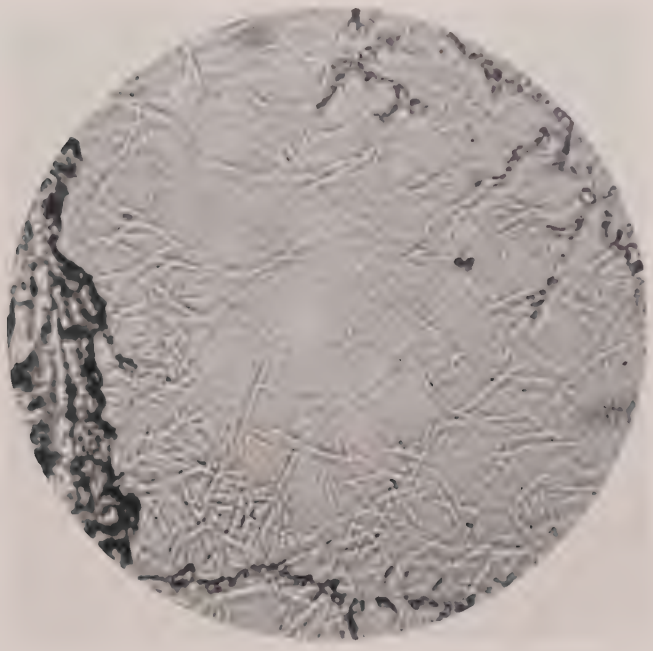

Fig. 2. Kristallen van het gewone strepenvirus van de tomaat

UIT DE BUITENLANDSCHE LITERATUUR

GEÏMPREGNEERD WIKKELPAPIER VOOR CITRUSVRUCHTEN

In het tijdschrift Hadar, vol. 12, blz. 227, 1939 komt een artikel voor, van Dr A. Farkas, Control of Wastage of Citrusfruit by impregnated wrappers, on a commercial scale. De schrijver behandelt hierin een aantal proeven, welke op ruime schaal genomen werden met citrusvruchten gewikkeld in papier, geïmpregneerd met diphenyl. Nadat door laboratorium experimenten de gunstige invloed van diphenyl op het tegengaan van de rotontwikkeling was gebleken, werden verschepingsproeven van Tel Aviv naar Roemenië en Engeland opgezet, welke een gunstig gevolg hadden.

De meeste verschepingen van Palestina uit vinden plaats in ongekoelde ruimen. Het percentage afval kan als gevolg van de hooge temperatuur en luchtvochtigheid daardoor soms tot 12% bedragen. In zelfde partijen, gewikkeld in gewoon papier of in geïmpregneerd papier bedroeg het afval-percentage bij aankomst in Engeland van de eerste groep b.v. 9,0% tegenover 1,5% van de tweede, terwijl soms nog grooter verschillen werden gevonden. In de meest succesvolle vergelijkende verschepingen, was het afval-percentage van de in geïmpregneerd papier gewikkelde vruchten 26 × zoo klein als van de contrôle.

De gunstige werking van het diphenyl is terug te voeren op het feit, dat het zeer langzaam uit het papier verdampt. Zou men een geïmpregneerd papier vlak uitspreiden, dan zou de diphenyl in een dag verdampt zijn; tusschen de dicht op elkaar gepakte vruchten in een kist gaat dit proces veel langzamer.

De geur, eigen aan diphenyl, blijkt niet in hinderlijke mate op het fruit overgedragen te worden, terwijl omgang met het middel zelf ook voor den mensch onschadelijk blijkt te zijn.

Mede doordat het fruit gewikkeld in met diphenyl geïmpregneerd papier 1—2 maanden langer te bewaren is, blijkt het gebruik van dit papier ook economisch volkomen verantwoord.

In Engeland is hetzelfde middel beproefd bij appelen. Hierbij bleek het gebruik echter niet mogelijk, doordat schilbeschadigingen optraden.

T. van Hiele, l.i.

GIFTIGHEID VAN DERRIS VOOR BIJEN

F. K. Böttcher, *Untersuchungen über den Einfluss von Pflanzenschutzmitteln auf die Bienen*, IV. Teil: *Die Wirkung von Derris auf die Bienen.* Ztschr. f. angew. Entom., XXV, 4, Febr. 1939.

Schrijver heeft evenals van de andere, gebruikelijke bestrijdingsmiddelen zoowel met laboratorium- als praktijkproeven nagegaan, welk gevaar voor de bijen ontstaat bij het gebruik van Derris (rotenon) houdende bestrijdingsmiddelen in land- of tuinbouw.

Met zuiver rotenon werd door 2 proeven in het laboratorium bij verschillende temperatuur vastgesteld, dat deze stof niet als ademhalingsvergift werkt.

De werking als maagvergift werd zoowel voor rotenon als voor Derris-extract nagegaan. Verschil in temperatuur (20 °C of 34,5 °C) leverde slechts weinig verschil in giftigheid op. Wel bleek, dat zuiver rotenon slechts half zoo giftig was als Derris-extract met overeenkomstig rotenongehalte. Beide werden in een suspensie toegediend. Dit verschil kan een gevolg zijn van het feit, dat Derris-extract naast rotenon nog andere, toxische stoffen bevat, doch ook is de grootere fijnheid van de rotenondeeltjes in het Derris-extract waarschijnlijk van invloed. De gemiddelde dosis letalis ligt ongeveer bij 0,0022 mg rotenon in Derris-extract en 0,0045 mg rotenon bij zuiver rotenon per dier.

Een soortgelijk doch niet zoo sterk verschil tusschen zuiver rotenon en Derris-extract kwam ook tot uiting bij de proeven tot vaststelling van de giftigheid als contactvergift. De resultaten der onderscheidene proeven stemden echter niet zoo goed overeen als bij het maagvergiftonderzoek. De gemiddelde doodelijke concentratie van de sproeivloeistof ligt in Derrisextract bij 0,15% rotenon (= ± 1 : 600).

Proeven met door kleuring gemerkte bijen, die weder tot het volk toegelaten werden, toonden in overeenstemming met de laboratoriumproeven aan, dat sproeivloeistof van gebruikelijke sterkte (rotenon 1 : 5000) zonder uitvloeier geen merkbare invloed op de bespoten of ondergedompelde bijen uitoefende, en met uitvloeier slechts bij weinige dezer dieren doodelijke gevolgen had. Door oplossing van 10-voudige sterkte, dus 1 : 500 rotenon, werden vrijwel alle ondergedompelde bijen, ongeacht de aanwezigheid van een uitvloeier, gedood.

Bij de groote praktijkproeven en de proeven in vliegkooien werd ook Derris als stuifmiddel geprobeerd, waarbij steeds dezelfde ervaringen werden opgedaan. Een rotenongehalte van 1 : 5000 in sproeimiddelen en $1\frac{3}{4}$% in stuifpoeders (dit laatste

is zeer hoog!) veroorzaakten geen ernstige verliezen. Kastbijen en broed bleven geheel van elken invloed verschoond en ook van de vliegbijen succombeerde slechts een nauwelijks waarneembaar aantal. Zelfs oplossingen van 10-voudige sterkte bleken in de praktijk slechts weinig gevaarlijk te zijn.

Schrijver komt tot de conclusie, dat de praktische toepassing van Derris als stuif- of sproeimiddel geen ernstig gevaar voor de bijenvolken beteekent. B. J. HERMANS.

„DÉGÉNÉRESCENCE DU FRAISIER À GROS FRUITS"
Jaarboek van „le Fonds National de la Recherche Scientifique et l'Industrie", Bruxelles, 1938, blz. 295—300.

Bovengenoemd artikel geeft een résumé van de in België verrichte onderzoekingen naar de oorzaken en de bestrijding van de degeneratie der aardbeien.

De aardbeiencultuur neemt in België een belangrijke plaats in, zoowel als cultuur in den open grond (± 1000 ha) als onder glas (± 500 kassen). De laatste decennia trad ook in dit land een onrustbarende achteruitgang in den gezondheidstoestand van de aardbei op.

Op het Laboratorium voor Toegepaste Genetica aan de Universiteit te Leuven werd door Prof. A. G. DUMON en A. SWARTELÉ beproefd of langs serologischen weg een virus in de zieke planten aangetoond kon worden. De uitkomsten van dit onderzoek, waarin zoowel zieke als gezonde planten van verschillende soorten betrokken werden, gaven echter geen zekerheid. Wel werd aangetoond, dat de verschijnselen niet van bacteriëelen aard zijn; verschillende uit aardbei geïsoleerde bacteriën kwamen zoowel in zieke als in gezonde planten voor.

Selectieproeven onder verschillende uitwendige omstandigheden (verschillen in grondsoort, klimaat, hoogte) werden opgezet. Hierbij bleek het weer, dat zieke moederplanten steeds eveneens zieke uitlooper-planten leverden; i.h.a. was het materiaal uit de Ardennen gezonder dan dat van elders.

Het bleek echter niet mogelijk langs hygiënischen weg alléén tot een oplossing van het probleem der degeneratie van de aardbei te komen. Daarom werd een geheel andere weg ingeslagen.

Langs vegetatieven weg leveren zieke moederplanten een zieke nakomelingschap; *zaailingen* van zieke ouderplanten kunnen echter gezond zijn. Onderzocht werd daarom de mogelijkheid de aardbei voortaan generatief te vermeerderen, in plaats van vegetatief, zooals thans algemeen gebruikelijk is. De groote moei-

lijkheid daarbij was de heterozygote aard van alle in cultuur zijnde aardbei-soorten, die niet zaadvast zijn.

Toch gelukte het L. Sels (Etablissement Sels te Duffel) na eenige jaren door zelf- en kruisbestuiving reeds uit enkele bestaande soorten groepen individuen te verkrijgen, die zoowel in vegetatieve kenmerken als eigenschappen van de vrucht, vrijwel niet van een der oorspronkelijke soorten te onderscheiden zijn. In het bijzonder had hij dit gunstige resultaat bij de Princesse Clémentine, terwijl het bij de Deutsch Evern, de Tardive de Léopold en de Trouvaille vrijwel is bereikt.

Op deze wijze zal het mogelijk moeten worden de oude handelssoorten geleidelijk te vervangen door nieuwe, gezonde en krachtige hybriden, die steeds opnieuw weer uit zaad worden opgekweekt. De aardbeiencultuur zal daarbij een fundamenteele verandering ondergaan, daar deze het karakter zal krijgen van een cultuur van een twee- of meerjarig gewas, i.p.v. die van een vaste plant.

21-5-'39 H. G. Kronenberg, l.i.

DIE WICHTIGSTEN KRANKHEITEN AN LAGERNDEN ÄPFELN UND IHRE VERHÜTUNG

Van de hand van Dr. W. Holz is in de Vlugschriften 174/75 van de Biologische Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, een overzicht verschenen van enkele der belangrijkste ziekten, welke tijdens de bewaring van appelen kunnen optreden.

De ziekten worden verdeeld in: parasitaire en niet-parasitaire, terwijl afzonderlijk de maatregelen worden besproken welke genomen kunnen worden om deze ziekten te voorkomen.

De schrijver wijst op de buitengewoon gemakkelijke verspreiding van *Penicillium* door de bewaarruimte.

Bitterrot, veroorzaakt door een *Gloeosporium sp.*, wordt door lage temperatuur slechts weinig geremd; de sporenvorming zou er zelfs door bevorderd worden. *Gloeosporium* zou in hoofdzaak door beestjes w. o. mijten worden verbreid. Schurft is vaak uitgangspunt voor bitterrot. De vrucht krijgt een bittere smaak.

Evenals *Gloeosporium* wordt ook *Botrytis* niet belangrijk in haar groei door lagere temperaturen geremd.

Moniliarot dringt bij voorkeur binnen door wondplekken in de vrucht, zooals die veroorzaakt door de appelmade en door wespen.

Klokhuisrot meestal veroorzaakt door *Fusarium* heeft gewoonlijk als ingangspoort de kelk.

Kelkrot, een minder vaak voorkomende ziekte, heeft als ver-

oorzaker *Nectria galligena*, de gewone kankerzwam.

Op de groote verspreidingsmogelijkheid van schurft in de bewaarruimen wordt gewezen, wanneer hierin tijdelijk, als gevolg van ondoelmatige bediening, condensatie op de vruchten plaats heeft.

Een gekleurde bijlage illustreert op zeer duidelijke wijze een zestal parasitaire ziekten.

Van de niet parasitaire ziekten wordt o.m. besproken „Scald". Hierbij treedt een zeer oppervlakkige bruinkleuring van de schil op, terwijl het vruchtvleesch zelf volkomen gezond blijft. Als oorzaken worden genoemd, dat de vruchten over hun optimale rijpheidsstadium heen zijn en dat de temperaturen in de bewaarruimte ongunstig zijn geweest. In den laatsten tijd wil men deze ziekte toeschrijven aan giftige bestanddeelen, welke uit de rijpende vrucht zelf ontwijken. (Dat hiervoor aethyleengas aansprakelijk gesteld zou moeten worden berust vermoedelijk op een vergissing. Dit werkt wel stimuleerend op de rijping; de eigenlijke Scald-verschijnselen zijn echter terug te voeren op bepaalde esters, welke eveneens door de vrucht zelf worden afgescheiden).

Vorstplekken, bestaande uit bruingekleurde, ingezonken onregelmatige gedeelten van de schil zouden alleen ontstaan beneden 0 °C. (In de praktijk en ook in de Engelsche literatuur kan men echter vaststellen, dat hetzelfde verschijnsel, Soft Scald, ook boven 0 °C voorkomt. In de Amerikaansche literatuur stelt men Soft Scald zelfs op één lijn met lage-temperatuurbederf).

Onder den naam „Fruchtfleischbräune" worden een aantal gevallen beschreven, welke gevolg zouden zijn van temperaturen beneden 0 °C, sterk wisselende temperatuur, te hooge temperatuur of ouderdom. (Vermoedelijk worden hier een aantal ziekten onder één naam samengevat met geheel verschillende oorzaken. Al te duidelijk is de schrijver niet bij het bespreken van de physiologische ziekten, terwijl men den indruk krijgt, dat een en ander niet voldoende uit elkander gehouden is.)

Bij het bespreken van de maatregelen ter voorkoming van ziekten wordt de nadruk gelegd op preventieve maatregelen als boomgaardverzorging, zorgvuldige behandeling, hygiëne bij de bewaring. Aangeraden wordt geen fruit in één ruimte te bewaren met andere producten, waarvan de lucht zou kunnen worden overgenomen, zooals aardappelen, carbolineum, enz.

Ingeval niet voldoende bergruimte ter beschikking is, beveelt men nog aan om in kuilen van 1 m breed bij 30–40 cm diep te

bewaren. De appelen worden daartoe op een onderlaag van turf of dergelijke, 60 cm hoog opgestapeld en daarna afgedekt met turf en aarde. Bewaren in hoopen mag echter plaats eerst vinden, wanneer de vruchten geheel „uitgezweet" zijn. Voorts wordt de nadruk gelegd op een regelmatige controle over het te bewaren product. T. VAN HIELE, l.i.

BESTRIJDING VAN DE AARDBEIENMIJT

R. WIESMANN, *Untersuchungen über die Biologie und Bekämpfung der Erdbeermilbe, Tarsonemus fragariae H. Zimmermann*, Vorl. Mitt. a. d. Vers. Anst. Wädenswil, Land. Jahrb. d. Schweiz 1937, pp. 335–348.

Waar de Tarsonemus-mijten sterk optreden, was het tot nu toe vrijwel onmogelijk, mijtenvrij plantmateriaal te kweeken, met het gevolg, dat de mijten uit de kweekerijen naar de particuliere tuinen worden overgebracht. In verband met het voorloopig karakter van zijn publicatie gaat de schrijver niet nader in op de vraag, of de in Europa op aardbeien levende mijtensoort identiek is met *Tarsonemus pallidus*, in Amerika op cyclamen voorkomend. Ook geeft hij slechts een korte beschrijving der levenswijze, doch beschrijft vooral de bestrijding.

De tot nu toe geprobeerde sproei- en stuifmiddelen hebben in den regel gefaald. De warmwaterbehandeling acht schrijver onbruikbaar, omdat de voor de mijten doodelijke temperatuur te dicht de voor de planten schadelijke temperatuur nabij komt en omdat de uitvoering der methode nogal ingewikkeld is. Zelf heeft de schrijver een groot aantal begassingsmiddelen beproefd op aangetaste planten in pot en op losse bladeren. Het meerendeel dezer middelen bleek of onvoldoend werkzaam of schadelijk voor de planten te zijn. Petroleumaether, mono- en dimethylaniline, aether en pyridine beloofden wel resultaat. Doch practisch aan te bevelen bleek een begassing gedurende 4 tot 6 uur met $1^1/_2$ tot 2 volume procent S-Gas (methylbromide, kookpunt 4,5 °C) bij een temperatuur van 18 tot 20 °C. Bij de proeven werd reeds bij 15 °C volledig resultaat bereikt. Ook de eieren werden bij deze behandeling gedood, wat bij een warmwaterbehandeling niet volkomen gelukt.

De begassing kan uitgevoerd worden in een goed sluitende, metalen kist. Doordat het methylbromide wordt afgeleverd in glazen empullen, die in de begassingsruimte worden verbrijzeld, is de behandeling zeer eenvoudig uitvoerbaar.

B. J. HERMANS.